

31671 E/16

A96 804

SASA/ 29.08.80

*J5 7042-632

29.08.80-JP-119313 (10.03.82) A61k-35/24 A61k-37/02

Double stranded DNA - D-glutaric acid-D-lysine copolymer adduct - used for treating auto:immune diseases, esp. systemic lupus erythematoses

A(10-E, 12-V1) B(4-84A, 4-C3, 12-A7, 12-D2) 4

179

autoimmune diseases, particularly systemic lupus erythematoses. dsDNA-D-GL may be administered orally, subcutaneously or intraperitoneally at a single or in divided doses as an aq. soln. of 10-50 mg/ml once or several times a week.

PREPARATION

DNA, commercially available or extracted from animal tissues, is treated ultrasonically in order to make the size uniform, and then with nuclease to give dsDNA. dsDNA is oxidized with NaIO₄ in H₂O or a buffer soln. under cooling or at room temp. for 1-2 hr. The lysine copolymer (D-GL) in the same solvent as above is added (excess NaIO₄ is removed by addition of ethylene glycol) at pH 8-10 under cooling or at room temp. for 1-12 hr. The product is then reduced with NaBH₄ to give the adduct, which may be purified by gel filtration or chromatography using ion exchange resins.(8ppW52)

Adduct of double-stranded DNA with D-glutamic acid-D-lysine copolymer is new. The adduct (dsDNA-D-GL) has the following physico-chemical properties: (i) appearance: amorphous white powder; (ii) mpt. 263-4°C (dec); (iii) solubility: soluble in H₂O, 0.01M phosphate buffer, aq. NaCl; insoluble in MeOH, EtOH, BuOH, Me₂CO, EtOAc, CHCl₃; (iv) specific rotation: $[\alpha]_D^{25} + 36.67$; (v) acidity: pH 5.8-6.0 (1.2% aq. soln.); (vi) colour reaction: positive to α -naphthol, diphenylamine, cysteine H₂SO₄, indole, Feulgen's, biuret, Cl-KI, and Cu-Folin reactions; negative to Lieberman's, Zimmerman, and FeCl₃ reactions; (vii) elemental analysis: C 42%, H 6%, N 13%; and (viii) characteristic IR and UV spectra.

USE/ADVANTAGE

dsDNA-D-GL specifically induces immunological tolerance for double-stranded DNA (dsDNA) to decrease dsDNA antibody titre and cell number in dsDNA antibody production, and is effective in treatment or prevention of

J57042632

BEST AVAILABLE COPY

11

⑯ 日本国特許庁 (JP)

⑰ 特許出願公開

⑯ 公開特許公報 (A)

昭57-42632

⑯ Int. Cl.³
A 61 K 37/02
35/24

識別記号

厅内整理番号
7138-4C
7138-4C

⑯ 公開 昭和57年(1982)3月10日
発明の数 3
審査請求 未請求

(全 8 頁)

⑯ 二本鎖DNAとD-グルタミン酸-D-リジンコポリマーとの結合物およびその製造法ならびにこれを含む薬剤

⑯ 特願 昭55-119313

⑯ 出願 昭55(1980)8月29日

⑯ 発明者 佐々木毅

塩釜市桜ヶ丘8-2

⑯ 出願人 佐々木毅

塩釜市桜ヶ丘8-2

⑯ 出願人 石田名香雄

仙台市角五郎一丁目5-40

⑯ 代理人 弁理士 有賀三幸 外1名

明細書

水溶性)

⑯ 二本鎖DNAとD-グルタミン酸-D-リジンコポリマーとの結合物およびその製造法ならびにこれを含む薬剤

2. 特許請求の範囲

I. 次の物性

① 物質の色 集定形白色粉末

② 鹿解点 263~264°C (分解)

③ 溶解性 水、0.01Mリン酸緩衝液、生理食塩水に可溶；メタノール、エタノール、ブタノール、アセトン、酢酸エチル、クロロホルムに不溶

④ 比旋光度 $[\alpha]_D^{25} = +36.67$

⑤ 酸基性・碱性の區別 pH 5.8~6.0 (1.2%)

⑥ 呈色反応 α-ナフトール反応、ジフェニルアミン反応、システィン試験反応、インドール反応、フォイエルゲン反応、ピクレット反応、C6-KI反応、調-フォリン反応は陽性；リベルマン反応、ジンメルマン反応、塩化第一鉄反応は陰性

⑦ 示外線吸収スペクトル 第1図

⑧ 示外線吸収スペクトル 第2図

⑨ 元素分析組成 C:約4.2%、H:約0.6%、N:約1.3%を有する二本鎖DNAとD-グルタミン酸-D-リジンコポリマーとの結合物、

2. 二本鎖DNAの酸化型とD-グルタミン酸-

D-リジンコポリマーを反応せしめ、次いでこれを還元することを特徴とするニ本鎖DNAとD-グルタミン酸-D-リジンコポリマーとの結合物の製造法。

3. 次の物性

- (1) 物質の色 無定形白色粉末
- (2) 融解点 263~264°C(分解)
- (3) 溶解性 水、0.01Mリン酸緩衝液、生理食塩水に可溶；メタノール、エタノール、ブタノール、アセトン、酢酸エチル、クロロホルムに不溶
- (4) 比旋光度 $[\alpha]_D^{25} = +36.67$
- (5) 塩基性・酸性の区別 pH 5.8~6.0(1.2% 水溶液)
- (6) 呈色反応 α -ナフタル反応、ジフェニルアミン反応、システィン反応、インドール反応、フオイルグラン反応、ピウレット反応、C8-KI反応、銅-フォリン反応は陰性；リーベルマン反応、ジシメルマン反応、塩化第二鉄反応は陽性

- (7) 赤外線吸収スペクトル 第1図
- (8) 赤外線吸収スペクトル 第2図
- (9) 元素分析組成 C:約42%、H:約6%、N:約13%を有するニ本鎖DNAとD-グルタミン酸-D-リジンコポリマーとの結合物を有効成分として含有する薬剤。

3. 発明の詳細な説明

本発明は新規なニ本鎖DNAとD-グルタミ

ン酸-D-リジンコポリマーとの結合物およびその製造法ならびにこれを有効成分として含む自己免疫性疾患治療剤に関する。

自己免疫性疾患は、自分自身で自己抗体(自分自身の組織抗原に対して抗体様の活性をもつもの)を産生する疾患であり、自分自身の組織抗原に対して抗体をもつてゐる人は抗体を産生するため、自分自身の組織、細胞を自ら破壊するという極めて不合理的な疾患である。そして、自己免疫性疾患には、全身性エリテマトーデス(以下SLEと略記する)、硬皮病、交感性神経炎、重症筋膜炎、リウマチ性関節炎、自己免疫性溶血性貧血等がある。

SLEでは、自己抗体としてデオキシリボ

酸(DNA)抗体、赤血球抗体、リンパ球抗体及びその他の組織抗体が血液中に出現し、このリンパ球抗体の出現はリンパ球の減少、赤血球抗体の出現は溶血性貧血等の病態を惹起する。この中最も問題とされるのはDNA抗体であり、組織の破壊によつて細胞内から出てきたDNAが血液中でDNA抗体と反応してDNA-DNA抗体免疫複合体を形成し、血管炎、腎炎の原因となり、腎障害、肺膜炎、骨髄球体障害等を誘発する。

従来、SLEの治療には、ステロイド薬又はこれとエンドキサン、サイクロホスファマイド等の免疫抑制剤との併用が使用されていた。

しかし、これらの薬剤を使用すると、免疫不全、消化器障害、血压亢進、骨粗鬆症、

急性大腸骨頭壞死、急性副骨皮質不全、白血球減少等の副作用を惹起する欠点があつた。

ある実状において、本発明者は自己免疫性疾患の治療に關し検討を行い、SLEにおいて、DNA抗体の產生を特異的に抑制することができれば、理想的な治療がなされるのではないかと考え、種々研究を行つた結果、二本鎖DNAとD-グルタミン酸-D-リジンコポリマーとの結合物が斯る作用を有することを見出し、本発明を完成した。

従つて、本発明の目的は、新規な二本鎖DNAとD-グルタミン酸-D-リジンコポリマーとの結合物を提供せんとするものである。

本発明の他の目的は、当該結合物を製造する方法を提供せんとするものである。

室温で1~12時間行うのが好ましい。

次いで、dsDNAの酸化物にD-グルタミン酸-D-リジンコポリマー(以下D-GLと略記する)を反応させる。D-GLは一般に市販されているものを使用でき、これは通常dsDNAの10~30重量倍を使用するのが好ましい。反応は、上記と同じ培養中、実際には、上記反応液にエチレングリコール等を加えて余分の過ヨウ素酸ナトリウムを除去したものにD-GLを加えて行うのが好ましい。反応系はpH 8~10に保てし、反応は冷却下ないし室温で1~12時間行われる。

次に、斯くして得られる反応物を水素化ホウ素ナトリウム等で還元すればdsDNAとD-GLの結合物が得られる。このものは、ゲル

本発明の更に他の目的は、当該結合物を有効成分として含む自己免疫性疾患治療剤を提供せんとするものである。

本発明の二本鎖DNAとD-グルタミン酸-D-リジンコポリマーとの結合物は、例えば次のようにして製造される。

まず、市販されているDNAあるいは動物から抽出したDNAを超音波等によつて処理してその大きさを縮えた後スクレアーゼ処理して二本鎖DNA(以下dsDNAと略記する)を得る。動物細胞DNAは種々異抗原性が少ないので、本発明では、如何なる種類の動物のDNAも使用できる。このdsDNAは過ヨウ素酸ナトリウム等の酸化剤で処理してその酸化物とする。反応は、水又は緩衝液中、冷却下ないし

沪過、イオン交換クロマトグラフィー等に付して未反応のdsDNA、D-GLを除去し、精製することができる。

このようにして得られた本発明の二本鎖DNAとD-グルタミン酸-D-リジンコポリマーとの結合物(以下、dsDNA-D-GLと略記する)は次のような物性を有する。

- (1) 固體の色 無定形白色粉末
- (2) 融解点 263~264℃(分解)
- (3) 溶解性 水、0.01Mリン酸緩衝液、生体重塩水に可溶；メタノール、エタノール、ブタノール、アセトン、酢酸エチル、クロロホルムに不溶
- (4) 比旋光度 $[\alpha]_D^{20} = +36.67$
- (5) 塩基性・酸性の区别 pH 5.8~6.0(1.2%水)

溶液)

(6) 亜色反応 α -ナフトール反応、ジフェニルアミン反応、システィン核酸反応、インドール反応、フォイエルゲン反応、ピクレット反応、C8-KI 反応、調-フォリン反応は陰性；リーベルマン反応、ジンメルマン反応、塩化第2鉄反応は陽性

(7) 赤外線吸収スペクトル 第1図

(8) 赤外線吸収スペクトル 第2図

(9) 元素分析組成 C:約4.2%、H:約6%、N:約1.3%

本発明のdsDNA-D-GLは、前述の実施例に示すごとく、これを動物に投与すると、特異的IC dsDNAに対する免疫寛容を誘導し、

dsDNA 抗体価及び dsDNA 抗体産生細胞数が著しく減少するので、自己免疫性疾患の治療及び予防をすることができる。dsDNA-D-GLは、例えば1.0～5.0mg/mlの水溶液とし、特に1回ないしは数回、経口、皮下注射、腹腔内注射等によつて投与するのが好ましく、急性病状悪化時には更に投与量を増すことができる。

次に実施例を挙げて説明する。

実施例1

(i) dsDNA の調製

市販仔牛胸腺DNA 2.00mgをリン酸緩衝生理食塩水(以下、PBSと略記する)1.00mlに溶解し、破砕装置(Tomy model 150P)を用いて、150Wで氷冷下、1分毎に休止

しながら10分間超音波処理を行つた。これにIC、0.1mM塩化亜鉛含有0.2M酢酸緩衝液(pH 5.0)5ml、スマレアーゼS(1.0³単位/ml)2.5ml、蒸留水17.5mlを加えて、一本鎖DNAを分離した後、4℃で24時間PBSに透析した。これをセファロース6Bカラムでゲルが通し、各々出分画のOD₂₆₀を測定すると、void volumeの位置に单一なピークが観察される。この部分を集め、複数処理して17.0mlのdsDNAを得た。

(ii) dsDNA-D-GLの製造

(i)で得たdsDNA 1.0mlを1.0%になるよう蒸留水に溶解し、氷冷下これに0.2M酢酸ナトリウム水溶液1.0mlを加え、これを1時間反応させた。室温で反応しながら1時間反応さ

せ、反応液にエチレンクリコールを0.006Mになるように加え、室温で10分間反応させて、過剰の酢酸ナトリウムを除去する。この溶液に、市販のD-GL(分子量49,000、D-グルタミン酸:D-リシン=6.0:4.0)2.00mgを1%炭酸水素カリウム水溶液2.0mlにとかしたものと、dsDNA: D-GL=1:2.0(質比)になるように加え、室温で1時間攪拌して反応させる。この間5%炭酸カリウムを加えて、反応液のpHを9.5に保持する。この反応液に水素化ホウ素ナトリウムを1.0%になるように加え、4℃で16時間放置後、透析チューブに入れて、0.1M炭酸ナトリウム水溶液に対して4℃で48時間透析した。これをセファロース6Bカラムで

グルーピングし、各出各分画の dsDNA 含量を OD_{260} にて、 D - GL 含量を Lowry - Folin 法で測定した。 OD_{260} の吸収ピークは void volume の位置に单一のピークを示した。 D - GL のピークは 2 本現われ、その 1 本は void volume の位置で、 OD_{260} のピークと完全に一致し、他の 1 本はこれより少くれて出現した。 OD_{260} のピークに従つて分画を集め、凍結乾燥して 4.6 g の粉末を得た。

斯くして得られた dsDNA - D - GL の dsDNA と D - GL の結合比は 1 対 4 であつた。またこのものの透達心分析の結果は第 3 図のとおりであり、单一であつた。

実験例 2

dsDNA - D - GL 投与による dsDNA に対する

にて測定した。

その結果は第 4 図のとおりであり、 dsDNA 抗体値は 14 匹中 11 匹で上昇せずまた、 ssDNA 抗体値は 14 匹中 6 匹は上昇しなかつた。また、 ssDNA 抗体値上昇抑制効果は dsDNA 抗体値上昇抑制より強く、 dsDNA - D - GL は dsDNA 抗体値の上昇を特異的に抑制することができる。

(ii) dsDNA - D - GL 投与後の脾臓中の dsDNA 抗体産生細胞数の測定：

dsDNA - D - GL を生理食塩水に溶解し、 $1.00 \mu g / ml$ 溶液を調製する。 4 ヶ月令の NZB / W F₁ 雄マウスに、先に調製した dsDNA - D - GL 溶液 1 ml を週 1 回づつ 12 ヶ月令まで、腹腔に注射した。対照には同様にして生理食塩水を投与した。 12 ヶ月令になつた時、

る免疫対応の誘導：

(i) dsDNA - D - GL 投与後の血中 dsDNA 抗体の測定：

dsDNA - D - GL を生理食塩水に溶解し、 $1.00 \mu g / ml$ 溶液を調製する。 4 ヶ月令の NZB / W F₁ 雄マウスに、先に調製した dsDNA - D - GL 溶液 1 ml を週 1 回づつ 12 ヶ月令まで、腹腔に注射した。対照には同様にして生理食塩水を投与した。 12 ヶ月令になつた時、採血し、血清中の dsDNA 抗体の力値と一本鎖 DNA (以下、 ssDNA と略記する) 抗体の力値を受身赤血球凝集反応法 (dsDNA 又は ssDNA を吸着させた赤血球の浮遊液に dsDNA 抗体又は ssDNA 抗体を含んだ血清を加えると抗原抗体反応を起こし赤血球が凝集する反応)

生理食塩水を投与した。 12 ヶ月令になつた時、マウスを殺し、脾臓を取り出し、ステンレス製筒の上におき、上から加圧し、脾臓細胞を筒の網目を通して加圧することにより、脾臓細胞をバラバラにする。この細胞に、 dsDNA を吸着させた羊赤血球と、モルモットの精液を加えた (IgG 抗体測定の時には、さらに IgG 血清を加えた) 後、 Cunningham - Szenberg chamber に封入する。この chamber を 3.7 °C で 1 時間インキュベートすると抗体を産生している細胞のまわりの羊赤血球が凝血し、ブラークを形成するので、この数を数えて dsDNA 抗体産生細胞数を求めた。

その結果は第 1 表のとおりであり、対照群では、 $1.9 \times dsDNA$ 抗体産生細胞数は 6135

回/脾臓、7回dsDNA抗体産生細胞数は2928細/脾臓であつたが、dsDNA-D-GL投与群では、それぞれ742細/脾臓、400細/脾臓でdsDNA-D-GL投与群では、dsDNAに対する免疫電答が誘導された。

以下余白

群	対	dsDNA-D-GL投与群		dsDNA-0-GL投与群		dsDNA抗体産生		dsDNA抗体産生		dsDNA抗体産生	
		19回dsDNA抗体産生 生細胞数/脾臓	細胞数	19回dsDNA抗体産生 生細胞数/脾臓	細胞数	7回dsDNA抗体産生 生細胞数/脾臓	細胞数	7回dsDNA抗体産生 生細胞数/脾臓	細胞数	7回dsDNA抗体産生 生細胞数/脾臓	細胞数
1	1	6700	0	ND	0	0	0	0	0	0	0
2	2	3000	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	3	12000	4800	0	0	0	0	0	0	0	0
4	4	4600	900	0	0	0	0	0	0	0	0
5	5	5700	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	6	3500	2800	0	0	0	0	0	0	0	0
7	7	5200	1600	0	0	0	0	0	0	0	0
8	8	5000	ND	ND	2600	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9	9	8500	ND	ND	1600	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10	10	8000	ND	0	0	0	0	0	0	0	0
11	11	9400	10400	0	0	0	0	0	0	0	0
12	12	2200	ND	2400	0	0	0	0	0	0	0
13	13	5500	ND	3600	0	0	0	0	0	0	0
14	14	6600	ND	100	0	0	0	0	0	0	0
$\bar{x} \pm s$		61357 ± 2650	29286 ± 3705	7429 ± 1250	400 ± 1131						

実施例3

既にdsDNA抗体を産生しているNZB/W F₁マウスに対するdsDNA-D-GLの治療効果

一群15匹の7ヶ月令の雌NZB/W F₁マウス(既にdsDNA抗体を産生しているもの)に、4. dsDNA-D-GL 100μg/回生理食塩水1mlを、週1回12ヶ月令まで腹腔内投与し、12ヶ月令での生存数を測定した。対照群には、同マウス21匹を使用し、生理食塩水を投与した。

その結果は表2のとおりであり、dsDNA-D-GLの投与により自己免疫性疾患を治すことができることがわかる。

第2表

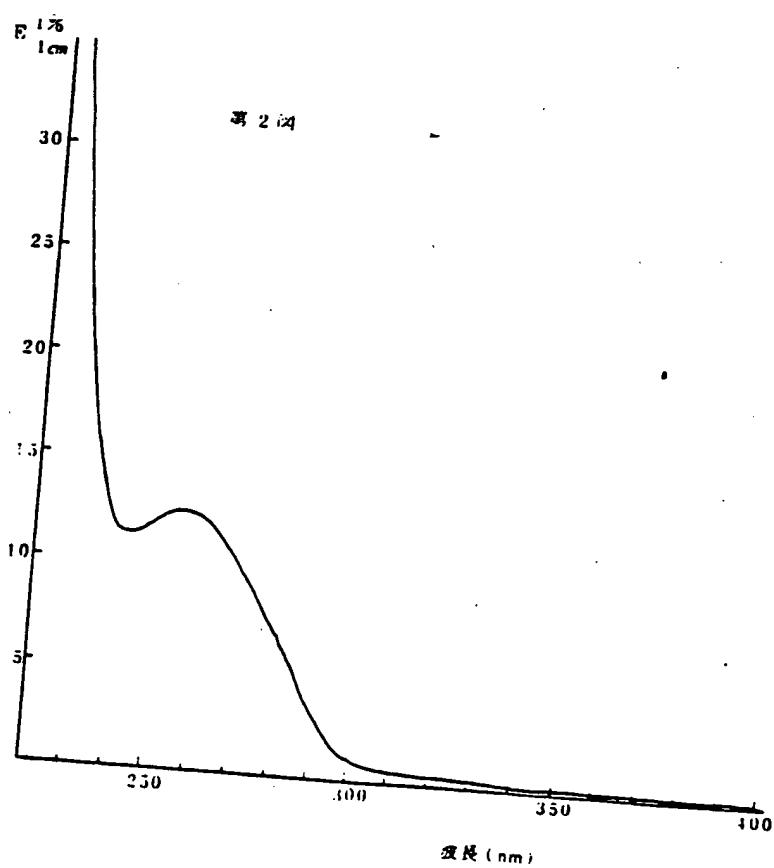
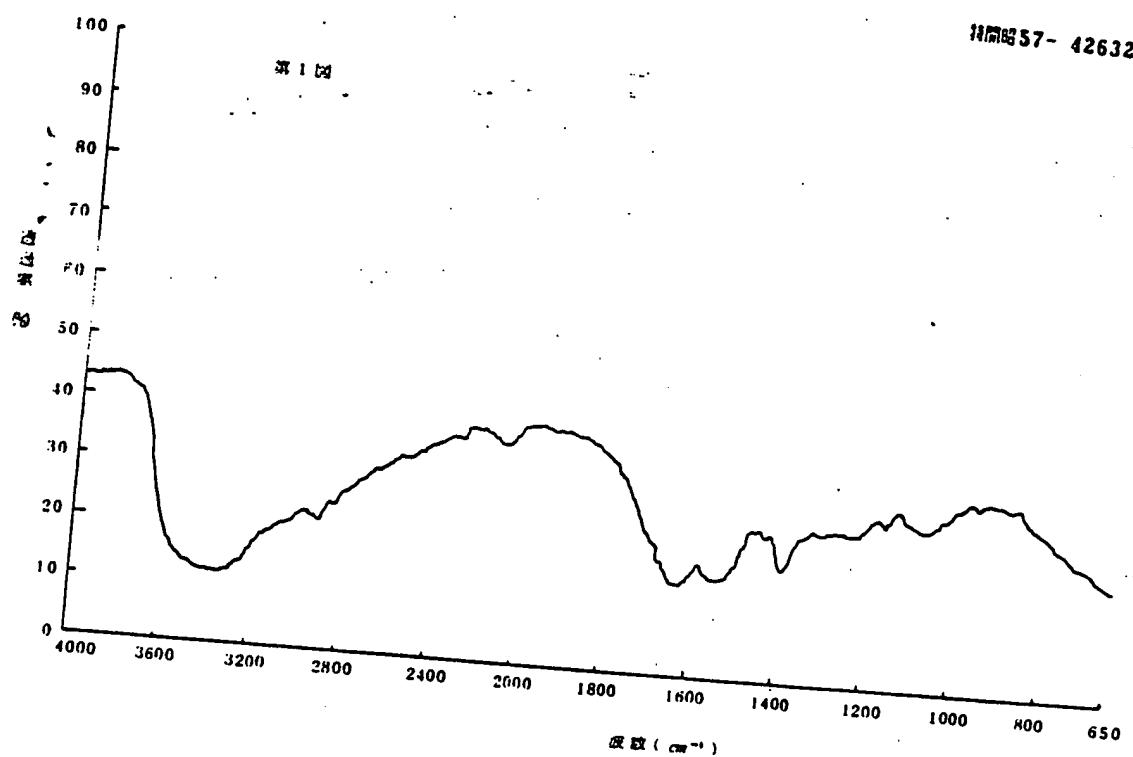
	生存数/使用数(回)		生存率(%)
対	14	/21	66.7
dsDNA-D-GL 投与群	15	/15	100

図面の簡単な説明

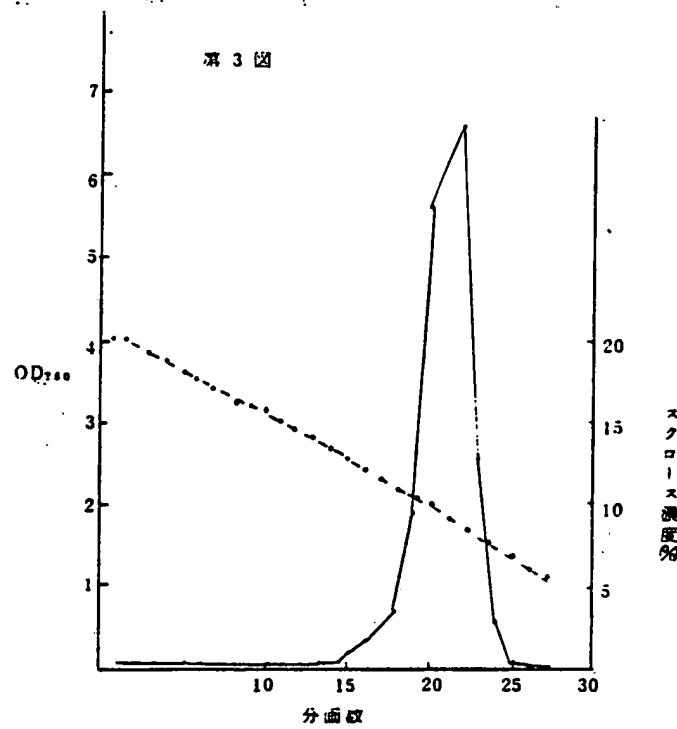
第1図は本発明の二本錠DNAとD-グルタミン酸-D-リジンコポリマーとの結合物の赤外線吸収スペクトル、第2図は同結合物の赤外線吸収スペクトル、第3図は同結合物の凝造心分析の結果、第4図は同結合物の投与による一本錠DNA抗体及び二本錠DNA抗体の抗体過剰抑制効果を示す。

以上

11月57-42632 (7)



第3図



第4図

